

## 癌臨床応用をめざすドラッグデリバリーシステム

### Drug Delivery System toward for Clinical Application of Cancer Therapy

加藤 敬一\*, 重川 庸介\*

Keiichi KATO\*, Yousuke OMOKAWA\*

The application of a Span vesicle, mainly composed of non-ionic surfactant Span80, to drug delivery system for a cancer therapy was investigated. *Euchuma Serra agglutinin* (ESA), which was a new lectin and was obtained by ethanol extraction from marine alga, specifically combined with a sugar chain of high mannose type of cancer cells (especially strong with colon cancer cell) and inhibited the growth of the colon cancer cell. Span vesicle on which ESA was immobilized together with polyethyleneglycole (PEG) for the protection from the macrophage attack was newly prepared (abbreviated as EPV). In the intravenous injection of the experimental conditions that [ESA] = 0.25mg/vesicle(ml); injection volume of vesicle suspension = 0.2ml; at 9<sup>th</sup> day after the first injection, the administration of EPV to BALB/c nude mouse with tumor of human colon cancer decreased in the reference growth of the mouse tumor down to about 48%. Moreover, the EPV was applied as a microcapsule-carrier by encapsulating an anti-tumor drug TXT, having the targeting function to the colon-cancer tumor (abbreviated as ETPV). The intravenous injection of ETPV under the above conditions ([TXT] = 0.7mg/vesicle(ml)) also decreased in the growth of the mouse tumor down to about 25% and also reduced the side effect from the TXT (the mouse weight increased), compared with the case of free-TXT injection.

Thus, we demonstrated the application of EPV, not using anti-cancer drug and also proposed the application of EPV as a drug microcapsule for the cancer therapy to reduce the drug side-effect.

*Keyword*: Drug delivery system, Vesicle, Cancer therapy, Colon tumor, Span80

## 1. 緒言

リポソーム（あるいは脂質ベシクル）を用いた Drug Delivery System (DDS)では、癌細胞などへの抗癌剤や遺伝子の導入が可能となり、その癌治療の実用化への期待は大きい。一般に DDS の研究では、天然リン脂質で調製したリポソームを用いた研究がほとんどである<sup>[16,17]</sup>。しかし、そのリポソーム

---

\* 愛媛大学・工学部・応用化学科 (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Ehime University, Bunkyo-cho 3, Matsuyama, Japan) E-mail:kato@eng.ehime-u.ac.jp, Tel&Fax: +81-(0)89-927-9928

は生体内での安定性、代謝性などに問題があると言われている<sup>[17]</sup>。そこで、筆者らがこれまで長年研究してきた、中性の界面活性剤 Span80 (Sorbitan monooleate) を主成分とする人工脂質ベシクル<sup>[3,4,10,15]</sup>を DDS の薬物キャリアーとして利用することを着想した。このベシクルは、安定性や代謝性においてすぐれた特性を有している<sup>[18]</sup>。

本研究では、この脂質ベシクルに癌細胞表面の固有の分子を認識するリガンド、すなわち癌細胞への“ミサイル誘導装置”を装着し、癌細胞への標的機能をベシクルに付与<sup>[13]</sup>して、癌治療の DDS<sup>[8-9,14]</sup>を開発する事を目的とした。

本研究では、その“ミサイル誘導装置”として、癌細胞糖鎖のハイマンノースを認識する新規レクチン ESA (*Eucheuma serra agglutinin*) に着目した。この ESA は、川久保ら<sup>[6]</sup>によって、海藻トゲキリンサイ(*Eucheuma serra*) より抽出されたものである。これまで筆者らが行ってきた多くの *in vitro* 実験より、この ESA は、正常細胞 (MCF10-2A(乳腺細胞)、Fibroblast(臍の緒由来)) にはほとんど結合せず、多くの癌細胞表面の異常な糖鎖構造を認識して特異結合し、その癌細胞のアポトーシスを誘発させ、特にヒト大腸癌細胞 (Colo201) に対して鋭い抗腫瘍効果を有していることなどが判明した<sup>[6]</sup>。

そこで、本研究では、前述の Span80 を主成分とするベシクル上に前述の ESA を固定化して、このベシクルをヒト大腸癌治療に利用することを目的として、まずヌードマウスによる、いくつかの動物実験を行った。

ベシクルを PEG 脂質でコーティングした、いわゆるステルスベシクル (マクロファージ攻撃の防御機能を有するベシクル) 上に ESA を固定化した ESA 固定化・PEG 固定化ベシクル (EPV) を調製した<sup>[5]</sup>。また、この EPV の抗腫瘍効果をさらに高めるために、癌末期に使用する抗癌剤タキソテール (TXT) をベシクル内に包括させた、ESA 固定化タキソテール内包 PEG 固定化ベシクル (ETPV) も調製した。これらのベシクルを、ヒト大腸癌細胞 (Colo201) を移植したヌードマウスに投与して、制癌効果に関する動物実験を行い、ベシクルの性能評価を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬・マウス

脂質ベシクルの主成分として Span80 を用い、膜強化剤としてコレステロールと大豆由来レシチンを精製したものを用いた。タンパク質固定化脂質アンカーに 1,2-dioleoyl-sn-glycero 3-phosphoethanolamine-N-(succinyl) (SUPE) を用いた。生体投与用ベシクルをステルス化するためには、日本油脂より提供された polyethylene glycol (PEG) 脂質 N-(monomethoxy polyethylene glycolcarbonyl) distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-020HCN) を用いた。分散剤として Tween80 (Polyoxyethylene sorbitan ester) を用いた。ベシクルの抗腫瘍効果改善のために、癌末期患者に使用される抗癌剤タキソテール、また癌細胞への標的のために、海藻由来のレクチンとしてトゲキリンサイから抽出した *Eucheuma serra agglutinin* (ESA) を標的リガンドとして用いた。細胞には、ヒト大腸癌細胞 (Colo201) を、細胞培養には牛胎児血清 FBS 含有 ERDF 培地を、マウスには BALB/c A メスヌードマウスをそれぞれ用いた。

### 2.2 マウス投与用ベシクルの調製

DDS キャリアーとして用いた ESA 固定化ベシクルの調製方法は、ベシクルの内部水相と外部水相にそれぞれ別の溶液を使用できる、二段階乳化法を用いた。また、ESA などのタンパク質のベシクル膜上への固定化には、二段階乳化法における二次乳化時にタンパク質を添加する、二次乳化法を使用した。ベシクルの調製の詳細については以下のとおりである。

ベシクルの構成成分である Span80-264mg、レシチン-24 mg、コレステロール-12 mg を、それぞれへキサン-3 ml 中に溶解した。この溶液を、ベシクルに内包させるリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、または

10.0 mg/ml タキソテール PBS 液を 0.6 ml 添加しながら、ホモジナイザーで 15,000 rpm で 3 分間攪拌して、W/O エマルジョンを作成した（一次乳化）。次に、W/O エマルジョン懸濁液中のヘキサンを減圧下で蒸発させ、W/L エマルジョンを得た。さらに、あらかじめ脂質アンカー-SUPE と結合させた ESA、分散剤である Tween80-96 mg、PEG 脂質をそれぞれ溶解した PBS-6 ml を加えた上で、ホモジナイザーを用いて 3,500rpm で攪拌してベシクルを得た（二次乳化）。ヘキサンを完全に除去するために、さらに 3 時間攪拌した後、一晚 4 °C で放置した。

生成されたベシクルは余剰な油分（Span80）を含むため、超遠心分離（151,000g, 240 min, 4°C）を行い、分離した上層の油層を除去した。ベシクルに固定化されなかった ESA と ESA 固定化ベシクルは、ゲルろ過により分離した（ゲル:Bio-Gel A-5m Gel, カラム:内径 7 mm, 長さ 50cm のものを使用）。このベシクル溶液を、10%-SDS 溶液を加えて破壊し、Lowly 法によりベシクルの ESA 固定化量を測定した。

## 2.3 大腸癌細胞 Colo201 の培養法

ヒト大腸癌細胞株 Colo201 は、10% 牛胎児血清（FBS）含有 ERDF 培地を用いて、37°C、5 %CO<sub>2</sub> 環境下の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

## 2.4 *In vitro* における細胞生存率の測定

マウスを用いた動物実験を行う前に、どの程度のタキソテール量が必要なのかを、*in vitro* 実験で確認する目的で、大腸癌細胞 Colo201 に対するタキソテールの毒性反応の検討を行った。また、タキソテールの分析は、高速液クロマトグラフィーを用いた<sup>[7]</sup>。

まず 2.3 で述べた方法で、大腸癌細胞 Colo201 を培養した。この Colo201 に各濃度のタキソテールを添加した。さらに 12 および 24 時間培養後、細胞を回収して、トリパンブルー染色を行った。各サンプルのトリパンブルーで染色された死細胞数と、染色されなかった生細胞数を血球計算板で測定した。これらより生存率（死細胞数 / 全細胞数）を算出した。

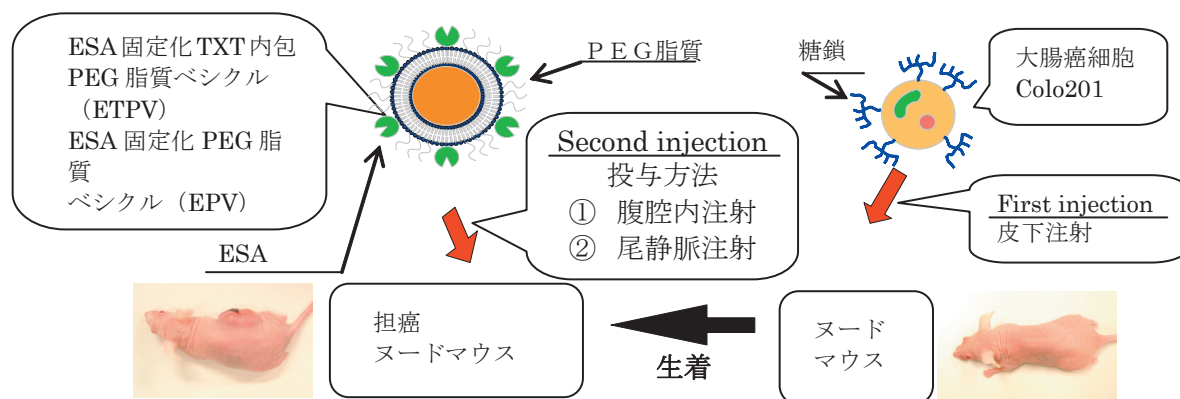
## 2.5 ノードマウスを用いた *Semi-vivo* 実験

動物実験を行う前に、より生体に近い実験モデル（*Semi-vivo*）での、ESA 固定化ベシクルの効果を検討した。

細胞 Colo201 はダルベッコ変法イーグル培地（10%FBS 添加）を用いて培養した。マウスは 6 週齢の BALB/cA メスノードマウスを用いた（1 群 6 匹）。群構成は次の 5 群である。1 群：対照群、2 群：ESA 非固定化ベシクル（ノーマルベシクル）、3 群：ESA 固定化ベシクル、4 群：タキソテール単独、5 群：ESA 固定化タキソテール内包ベシクルである。なお、添加サンプルデータ及び群構成を **Table 1** に示した。

**Table 1 The samples administrated and the sample concentrations**

群	群構成	ESA, TXT 濃度 [µg/ml]
1 群	対照群	生理食塩水
2 群	ESA 非固定化ベシクル	—
3 群	ESA 固定化ベシクル	ESA 濃度 13.0
4 群	タキソテール	タキソテール濃度 205
5 群	ESA 固定化タキソテール内包ベシクル	ESA 濃度 5.0 タキソテール濃度 205



**Fig.1 Schematic scheme of the administration of various samples to a mouse with Colo21 tumor**

## 2.6 担癌ヌードマウスへの抗癌剤内包ベシクルの投与

これまでの実験で、ESA 固定化 PEG 脂質ベシクル (EPV) が抗腫瘍効果を持つことがわかっているが、その効果は充分ではない。このため、癌末期患者に使用される抗癌剤タキソテール (TXT) を内包させ、抗腫瘍効果を向上させたベシクル ESA 固定化・TXT 内包・PEG 固定化ベシクル(ETPV)の検討を行った。ベシクル投与の実験方法の概略を Fig.1 に示す。

担癌ヌードマウス育種のために、大腸癌細胞 Colo21 ( $1\sim 5\times 10^6$  個/0.1ml) をヌードマウスの皮下へ移植し、マウスの皮下に癌細胞を生着させ腫瘍を形成させた。この担癌ヌードマウスに、サンプル 2 ml を 3 日ごとに投与した。サンプルの投与はマウス腹部に注射する腹腔内投与とマウス尾部の静脈に注射する静脈内投与を用いた。マウスは 1 群 6 匹を基本とした。

ベシクルによる治療効果は、次に述べる T/C より評価した。ベシクル投与開始日から、マウスの腫瘍の長径と短径を測定して、腫瘍体積を  $\{(長径) \times (短径)^2\} / 2$  の計算式で求めた。この腫瘍体積から、腫瘍体積の増加率を示す相対増殖率を各個体毎に (1) 式より算出した。

$$\text{相対増殖率} = (\text{N 日後の腫瘍体積}) / (\text{実験開始日の腫瘍体積}) \quad (1)$$

各実験群の相対増殖率を比較するために、control 群の相対増殖率の平均値 C と、各実験群の相対増殖率の平均値 T を用いた (2) 式を用いて、control 群の相対増殖率を 100 として規格化した T/C の値を求めた。この T/C は、対照群の腫瘍体積の増加と比較して、ベシクルを投与することにより腫瘍体積の増加が抑制された度合いを示すものである。

$$T/C = (\text{N 日後の対照群の相対増殖率 T}) / (\text{N 日後の control 群の相対増殖率 C}) \quad (2)$$

この T/C の最終的な評価を行う治療判断日は、各実験における control 群の腫瘍体積が指数関数的に増加する、対数増殖期中の最後の日とした。本実験内容の概要を以下整理して記した。

**①腹腔内投与：**ベシクルにさらなる抗腫瘍効果を付与するために、抗癌剤である TXT をベシクル内に包括させた ESA 固定化・TXT 内包・PEG 固定化ベシクル (ETPV) を調製した。この抗癌剤の内包による治療効果の変化を比較するために、以下の三種のサンプル、すなわち ETPV ([ESA]=0.25 mg/ml, [TXT]=0.7 mg/ml)、EPV (タキソテールを内包していない ESA 固定化 PEG 脂質ベシクル : [ESA]=0.25 mg/ml)、および TXT (フリー (内包させていない) の抗癌剤タキソテール 0.7mg/ml) を、マウスに 0.2ml/回腹腔内投与して動物実験を行った。Control には PBS を用いた。各サンプルの担癌マウスへの投与は、3 日ごとに行った。

**②静脈内投与 (TXT 高濃度)：**①の場合と同様の方法で、尾静脈投与による制癌効果についても検討した ([TXT]=0.7 mg/ml)。

**③静脈内投与 (TXT 低濃度)：**②の実験結果から判断して、ベシクルの効果をより明確に判定するために、TXT 濃度を、②の実験の抗癌剤 TXT 濃度よりも低下させて検討を行った ([TXT]=0.3mg/ml)。



([TXT]=0.5 mg/ml)。TXT、および同濃度の TXT を内包する ETPV を、control には PBS をそれぞれ用いた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 *Semi-vivo* 実験

本研究に使用するベシクルは非イオン性界面活性剤 Span80 を主成分とする界面活性剤ベシクルであり、従来のリポソームとは異なり流動性、安定性に優れている。そのベシクル構造については筆者らが明らかにし、二本鎖ソルビタンエステルが主成分であることを解明した<sup>[1]</sup>が、その詳細はここでは省略する。

マウス投与に用いるベシクルは前述のように PEG 脂質を ESA と同時に固定化している。これは血液中にベシクルを投与した場合に、マクロファージのベシクル攻撃を防御するためのもので、ステルス戦闘機にちなんで、一般にその防御効果はステルス機能と称されており、本ベシクルがそのステルス機能を有することは、筆者らの別の実験で確認されている。PV とは PEG 脂質を固定化した、ステルスベシクルを表している。

実験方法 2.3 で述べたように、計 5 群（各群 6 匹）でヌードマウスに前処理した Colo201 を皮下注射して、Colo201 の生着を調べる *semi-vivo* 実験を行った。腫瘍細胞(Colo201)移植後、21 日目の腫瘍生着率および、生着腫瘍の写真を Fig.2 に示した。Fig.2 に示すように、移植後 21 日までに生着が認められたのは、control 群および ESA 非固定化ベシクル作用群のみであり、それぞれ 6/6(100%)、5/6(83%) の生着率を示した。腫瘍重量は、control 群および ESA 非固定化ベシクル作用群、それぞれ 4.43g および 2.78g であった。ESA 固定化ベシクル群、タキソテール単独作用群、および ESA 固定化タキソテール内包ベシクルについては、移植後 12 週まで観察したが、生着は認められなかった。

ここで、control 群または ESA 非固定化ベシクルと、ESA 固定化ベシクルを比較した場合、ESA 固定化ベシクルでは腫瘍の形成は顕著に抑制されている。この抑制効果はベシクルに固定化された ESA によるものであるといえる。

#### 3.2 マウス実験における抗癌剤タキソテールの有効量の決定

抗癌剤タキソテール(TXT)を用いて、TXT 添加 12 時間後と 24 時間後の大腸癌細胞 Colo201 に対する毒性反応を *in vitro* で検討した。実験に用いたサンプル条件とその結果を Table 2 に示した。

TXT の添加濃度 500  $\mu\text{g/ml}$  (終濃度 25  $\mu\text{g/ml}$ ) から有意な低下がみられた。また、control と比較して、細胞数も減少しており細胞の増殖を抑制していることもわかる。

Table 2 に示すように、24 時間後と、12 時間の結果を比較すると、全細胞数では 24 時間後の方が減少している。これは抗癌剤により死滅した細胞が消失しているためである。こうして、実際の制癌効果としては 24 時間後の方が高いと判断した。

以上より、TXT は終濃度が 25  $\mu\text{g/ml}$  (添加濃度で 500  $\mu\text{g/ml}$ ) 以上で大腸癌細胞に有意な効果を発現

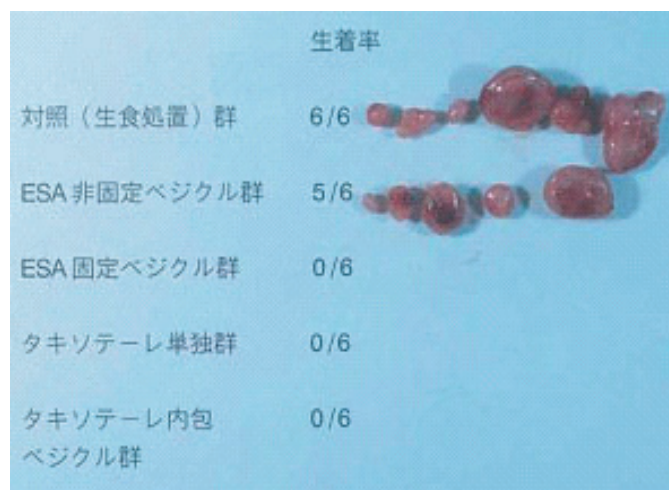


Fig.2 The graft survival of the transplanted Colo201 cell to nude-mice and the photographs of the tumor from the Colo201 cell

**Table 2 The effect of the addition of TXT to Colo201 cells on the cell viability *in vitro***

TXT 終濃度 [ $\mu\text{g/ml}$ ]*	死細胞数 [ $10^4$ cells]	全細胞数 [ $10^5$ cells]	生存率 [%]
TXT 投入後 1 2 時間後のデータ			
Control	1.0	3.5	97.1
6.25	1.5	2.6	94.2
12.50	3.3	1.8	81.4
25.00	17	2.9	39.5
37.50	27	2.8	1.8
50.00	23	2.4	2.1
TXT 投入後 2 4 時間後のデータ			
Control	1.0	4.4	97.7
6.25	2.0	3.2	93.8
12.50	9.3	2.4	61.9
25.00	8.1	1.3	37.3
37.50	8.8	1.3	32.7
50.00	7.8	0.81	3.1

\* Colo201 細胞培養のシャーレ中の TXT 濃度

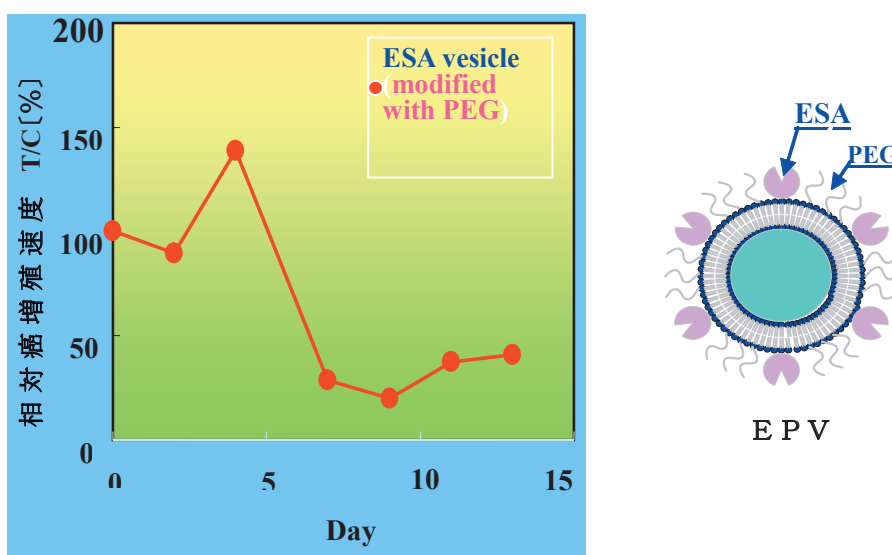
すると言える。

ここで、従来のベシクルの調製法では、ベシクル懸濁液の TXT 濃度は 200~300  $\mu\text{g/vesicle ml}$  であった。*in vitro* と *in vivo* で同じような比較はできない。ETPV 投与による動物実験において十分な制癌効果を得るためには、ベシクルの濃縮が必要となるということがおおよそ言えると判断した。そこで本実験では、超遠心濃縮 (151,000g, 4hour, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) によるベシクル懸濁液の濃縮を行い、制癌作用を発現するために十分な ETPV 濃度を実現させた。

### 3.3 抗癌剤内包ベシクルの担癌ヌードマウスへの腹腔内投与

ESA ベシクル (EPV) を担癌マウスに投与した場合、その癌細胞増殖速度をどの程度抑制できるか検討した結果を Fig.3 に示す。実験条件は 2.6 で述べたとおりである。なお、ベシクル濃度はベシクル懸濁液の濁度表示で 0.2 (UV 測定で波長 350nm) とした。投与後 3 日くらいで一時的に増殖速度は増加するが、その後低下して、2 週間後には T/C の値は約 48% 程度になり、癌増殖速度が抑制された。

さらに詳しく検討するため、ベシクル濃度を低くして (ベシクル濁度 0.1)、各サンプルの差が検討できるベシクル濃度



**Fig.3 The anti-tumor effect of the intraperitoneal injection of ESA-immobilized vesicle (EPV) by evaluating T/C values**

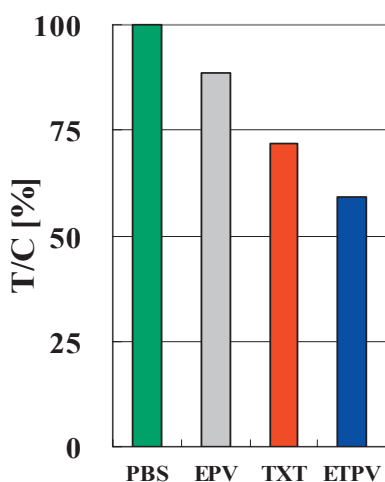


Fig.4 The histogram of the antitumor effect evaluated by the T/C values at 15days after the first administration of the various samples : [TXT] =0.7 mg/ml

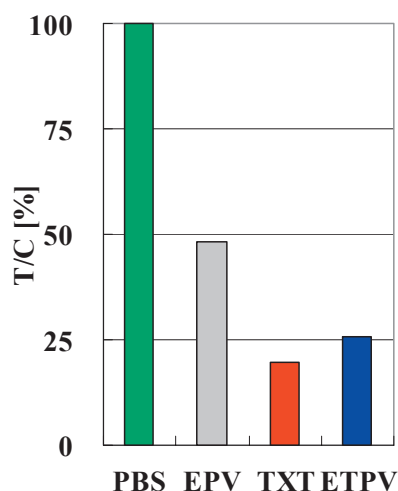


Fig.5 The comparison of the antitumor effect evaluated by the T/C values at 9 passing days among the samples intravenously injected

の条件で実験を行った。

Control に対する各実験群の癌腫瘍の相対増殖率(T/C)を、15日後のデータのヒストグラムとして Fig.4 に示した。Fig.4 に示すように、腫瘍の増殖はベシクル投与15日後で、EPV 群(89.2%)、2)TXT 群(71.8%)、3)ETPV 群(59.2%)の順に腫瘍の相対増加率が低減された。ETPV はフリーTXT と比較して腫瘍の増殖を10%近く低減させた。

これらの結果から、TXT を内包させた ESA 固定化ベシクルは、腹腔投与の場合で、従来のフリーのTXT、あるいはTXT を内包させていないベシクル (EPV) 使用の場合と比較して、より高い制癌効果を得ることができた。

なおここでは詳細は省略するが、ラジオアイソトープ (R I) 実験の結果、ETPV が担癌マウスの癌細胞を標的するデータを得ている。

### 3.4 高濃度の抗癌剤内包ベシクルの静注投与

ベシクルに内包する抗癌剤TXT濃度を、0.7mg/ml に固定して、ETPV の静脈投与による動物実験を行った。Fig.5 に示すように、投与開始9日後のヒストグラムでは、EPV(48.2%)、ETPV(25.9%)、TXT(19.6%)の順に相対増殖速度 (T/C) が減少した。3.3 の腹腔投与の結果 (Fig.4) と比較して、静脈投与では制癌効果は大幅に向上した。

また、抗癌剤を含まない EPV 群においても50%程度の制癌効果が得られた。ESA 自体が制癌効果を持つが、薬剤を含まない PEG 脂質リポソームにも制癌効果があるという報告もある。この EPV 群の制癌効果は、これらの複合の影響によるものと推察される。EPV での体重変化率は一時減少するがその後回復した。この結果は、抗癌剤を使用しない EPV 単独による癌治療の可能性を示した。

一方、腹腔内投与の場合に観察された、「抗癌剤をベシクルに内包させたことによる制癌効果の有利性 (フリーのTXT と比した ETPV の有利性)」は示されなかった。この原因は未だ明確ではないが、ベシクルは経時的に不安定であり、特に温度と相関してベシクルが破壊されることがこれまでの実験で明らかとなっている。このため血管内でベシクルからTXTが漏出下可能性がある。ベシクル濃度が高い場合、腹腔内投与ではあまり影響を与えなかった、漏出されたTXTが、静脈内投与では血管内に

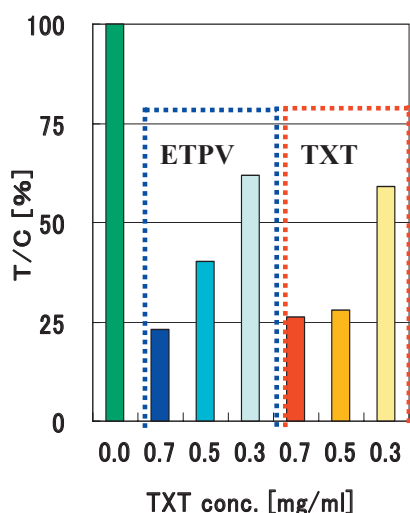


Fig.6 The comparison of the antitumor effect evaluated by the T/C values between ETPV and TXT which were intravenously injected

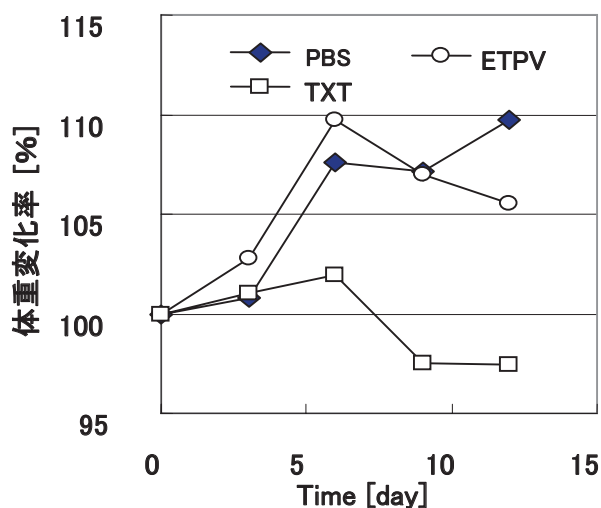


Fig.7 The comparison of the mice-weights variations with passing days among the samples of PBS, ETPV and TXT injected intravenously

直接投与するために、その漏出の影響が出やすくなったためと推定している。

### 3.5 低濃度の抗癌剤内包ベシクルの静注投与

3.4で行った抗癌剤 TXT 濃度よりも低い TXT 濃度(0.5mg/ml, 0.3mg/ml)をそれぞれ内包したベシクル投与による動物実験を行った。投与開始後 9 日後の相対増殖速度のヒストグラムの結果を、TXT 濃度が、0.7mg/ml の場合も含めて、Fig.6 に示した。

TXT 濃度が 0.5mg/ml の場合については、ETPV (T/C=40%) の方がフリーの TXT (T/C=27%) の場合よりも制癌効果が若干優れているが、抗癌剤をベシクルに内包させることによる有利性を確認することはできなかった。

しかし、TXT 濃度が 0.3mg/ml の場合については、その抗腫瘍効果は ETPV (T/C=62%)、TXT (T/C=58%) とともに同程度であった。一方、マウスの体重の変化率に関しては、Fig.7 に示す様に ETPV では control と同じような増加傾向がみられるのに対して、フリーTXT 投与の場合には体重は減少した。これは TXT をベシクルに内包することにより、TXT の副作用が抑制されることを示唆している。こうして、TXT 濃度が 0.3mg/ml の場合には、抗癌剤をベシクルに内包させることによる有利性が認められた。

これらの結果より、動物実験において、ESA 固定化・TXT 内包・PEG 固定化ベシクル (ETPV) を DDS に使用してヒト大腸癌治療臨床応用の道が開けた<sup>[2]</sup>。

## 4. まとめ

筆者らの研究グループが開発した海藻由来の新規レクチン ESA を、非イオン性界面活性剤 Span80 を主成分とする界面活性剤ベシクルに固定化し、このベシクルを DDS に利用してヒト大腸癌治療臨床応用を目的とする研究を行い、以下のような結論を得た。

- (1) 抗癌剤を使用しない ESA 固定化ステルスベシクル (EPV) を利用した大腸癌治療の可能性が示唆された。
- (2) 抗癌剤を内包したステルスベシクル (ETPV) は腹腔内投与において TXT よりも高い制癌効果を示した。



(3) 0.3mg/ml の TXT 濃度を有する ETPV の静脈投与実験では、同濃度のフリーTXT 投与の場合と同様な制癌効果を持ちながら、マウスの体重減少を抑制して、副作用を軽減させることが明らかになった。

(4) ETPV を DDS に使用して、ヒト大腸癌治療臨床応用の道が開けた。

今後、実用化に向けてより詳細な生体試験を行う必要がある。

## 5. 謝辞

本研究は都市エリア産学連携促進事業で実施したものである。また、一部は科研費基盤研究(B)(16360415)の支援を受けた。本研究を推進するに当たってご尽力をいただいた(財)えひめ産業振興財団の武知博紀氏、藤川周二氏、および愛媛大学の前地域共同研究センター長・清水顕教授に深謝の意を表す。

また、本研究は、愛媛大学(工学部、農学部、医学部)、ヤマキ(株)、国立病院四国がんセンター、との共同研究により行ったものである。本研究の遂行に中心的御協力をいただいた、愛媛大学の菅原卓也助手(農学部)、秋山助手(総合研究支援センター)に、また動物実験などにご協力をいただいた、能勢真人教授(医学部第二病理)、立石憲彦助教授(医療情報部)、藤原隆助教授・増田晴造講師(総合研究支援センター)に深謝の意を表す。

さらに、学外共同研究者としての、ヤマキ(株)の開発本部長・管純教氏、研究開発係長・川久保明宏氏、国立病院四国がんセンターの高嶋成光院長、佐伯俊昭臨床研究部長に多大なる御指導、御協力を頂いた。また、共同研究を行っている工学部、農学部の学生諸君にも多くの実験を担って頂いた。ここに深謝の意を表す。

## 6. 文献

- [1] 加藤敬一：リポソームの応用の新展開 ―人工細胞の開発に向けて―、エヌ・ティー・エス,407-414 (2005)
- [2] Keiichi Kato, Yousuke Omokawa, Koichi Akiyama, Takuya Sugahara, Akihiro Kawakubo and Toshiaki Saeki: Anti-cancer effect to colon cancer in either *in vitro* or *in vivo* using lipid vesicle combined with alga lectin ESA, *Proc. of the 10<sup>th</sup> Asian Pacific Confederatio of Chem. Eng. (APCChE)* , J-STAGE, Vol. 2004, No. SPACE pp.500- (2004)
- [3] K. Kato, P. Walde, H.Mitsui, and N. Higashi, *Biotechnology and Bioengineering*, 84 , No.4, 415-423 (2003)
- [4] 加藤敬一、微粒子工学大系第II巻 応用技術「癌治療」、フジ・テクノシステム、694-698 (2002)
- [5] 加藤敬一、秋山浩一、重川庸介：「ESA 固定化ベシクルによるヒト大腸癌治療の実用化をめざした動物実験」,化学工学会第35回秋季大会要旨集 J317, p436(2002).
- [6] Sugahara T., Y.Ohama, A. Fukuda, M. Hayashi, A. Kawakubo and K.Kato: The Cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles, *Cytotechnonogy*, 36, 93-99 (2002)
- [7] アベンティスファーマ編：タキソテール注、販売パンフ、(2002)
- [8] T.Sugahara, K.Kato, et.al: *Proc. of 11th Internatiol Biotechnology Symposium (Berlin)*, Vol.3, 79-81 (2000)
- [9] K.Kato, T.Sugahara, et.al: *Proc. of 11th Internatiol Biotechnology Symposium (Berlin)*, Vol.3, 83-85 (2000)
- [10] 加藤敬一、川嶋真一、菅原卓也：ケミカルエンジニアリング, 5 , No. 6 , 49-55 (2000)
- [11] K.Kato,T.Sugahara, et. al: *Proc. of 16th Internatiol Conference of European Society for Animal Cell*,

- (Lugano, Swizerland), Kluwer Academic Publishers, 429-431 (1999)
- [12] K.Kato,T.Sugahara,Y.Maruyama et. al: Proc. of 16th Internatiol Conference of European Society for Animal Cell, (Lugano, Swizerland) , Kluwer Academic Publishers, 433-435 (1999)
- [13] 加藤敬一 : BIOINDUSTRY, シーエムシー出版, 15, No.10, 11-18 (1998)
- [14] 加藤敬一・川嶋真一ら : 第 13 回生体機能関連化学シンポジウム, 1C117 (1998)
- [15] K.Kato, A.Tsutanaga and M.Shinozaki, Solv.Extr. Res.Dev .Japan, 4, 51-61 (1997)
- [16] 寺田弘、吉村哲朗 編：“ライフサイエンスにおけるリポソーム実験マニュアル”, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 (1994)
- [17] 野島庄七,砂本順三,井上圭三 編；“リポソーム” ,南江堂 (1988)
- [18] S.Matsumoto, M.Kohda and S.Maruta ; J.Colloid Interface Sci, 62, No1, 149~157 (1977)